ARTÍCULO CIENTÍFICO

Ana María Rey[1]
Diego Rosendo Chamorro[1]
y Margarita Ramírez [2]

Efecto de la doble inoculación de rizobios y micorrizas sobre la producción y calidad del forraje de *Leucaena leucocephala*

ABSTRACT

Title: **The effect of double inoculation of rhizobium and mycorrhiza on *Leucaena leucocephala* forage production and quality**

This work was aimed at evaluating the effect of double inoculation with rhizobios *Entrophospora colombiana* and *Glomus sp.* on *Leucaena leucocephala* (Lam) plants 30, 60, 90 and 120 days after germination. Agronomic, microbiological and chemical composition variables were evaluated. The treatment (T9) which included consecutive inoculation with C-202, *E. colombiana* and *Glomus sp.*, displayed the best agronomic and microbiological response, reflected in the highest forage production and nutritional quality, greatest b3 protein and phosphorus content. The mycorrhizal strains evaluated presented different behaviour and there was little efficiency in the treatment without inoculation. This corroborates the need for using double inoculation with native strains from effective arbuscular mycorrhizal associated with *L. leucocephala* to achieve greater production for this legume.

Key words: *Leucaena leucocephala, Glomus sp., Entrophospora colombiana,* rhizobium, Cornell Net Carbohydrates and Protein System (CNCPS).

RESUMEN

Esta investigación evaluó el efecto de la doble inoculación de bacterias rizobiales, *Entrophospora colombiana* y *Glomus sp.* sobre la producción y calidad de forraje de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit a los 30, 60, 90 y 120 días después de la germinación. A tal fin se evaluaron variables agronómicas, microbiológicas y de composición química. El tratamiento (T9) en el que se inocularon consecutivamente la cepa C-202, *E. colombiana* y *Glomus sp.* presentó las mejores respuestas agronómicas y microbiológicas y obtuvo la mayor producción y calidad nutricional del forraje expresada en incrementos de la proteína cruda, la fracción b3 de la proteína y el contenido de fósforo. Las cepas de micorrizas evaluadas mostraron un comportamiento diferente entre sí, mostrando infectividad mas no efectividad en el tratamiento sin inocular. Esto corrobora la necesidad de utilizar la doble inoculación con cepas nativas de micorrizas arbusculares efectivas asociadas a *Leucaena leucocephala* para lograr una mejor respuesta productiva de esta leguminosa.

Palabras clave: *Leucaena leucocephala, Glomus sp., Entrophospora colombiana,* rhizobium, Cornell Net Carbohydrates and Protein System (CNCPS).

INTRODUCCIÓN

La Región Caribe Colombiana es una llanura extensa con diez millones de ha que corresponden al 8.7% del territorio nacional (IGAC, 1996). La zona más extensa corresponde al bosque seco tropical, que cubre aproximadamente el 60% del área. El Valle del Cesar, aporta cerca del 38% de la producción nacional de carne y el 43% de leche, producción basada fundamentalmente en pastoreo de gramíneas nativas (1.4 millones de ha) e introducidas (1.9 millones de ha), ambas asociadas con leguminosas espontáneas (Corpoica, 1999). Sin embargo, las condiciones ambientales del suelo de la zona limitan la disponibilidad y calidad del forraje durante períodos prolongados del año.

Como una alternativa se han implementado sistemas silvopastoriles conducentes a superar la escasez de forraje en la época de sequía, en donde las leguminosas arbóreas son un componente importante para mejorar las condiciones fisicoquímicas y biológicas del suelo. Dentro de éstas se destaca *Leucaena leucocephala* por su alto rendimiento en biomasa (21 $t \cdot ha^{-1}$ MS), elevado contenido proteico, resistencia a sequías, habilidad de fijar el nitrógeno atmosférico y alta selectividad por los bovinos (Chamorro *et al.*, 1998; Chamorro, 2000).

Debido a la problemática de la región y al alto potencial de uso de *L. leucocephala* para la solución de algunos de estos limitantes, el presente trabajo tuvo como objetivo aislar bacterias diazotróficas rizobios a fin de evaluar la producción y calidad del forraje por medio de la inoculación de rizobios y micorrizas arbusculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fase I. Se recolectaron raíces noduladas y suelo rizosférico en arreglos silvopastoriles de *Leucaena leucocephala* del Centro de Investigación Motilonia de Corpoica (Valle del Cesar). Se evaluaron la composición química y la población micorrizogénica del suelo. Este mismo suelo fue utilizado como sustrato para la evaluación en vivero. A partir de las raíces noduladas se aislaron y purificaron los rizobios.

Fase II. Respecto de la capacidad fijadora de nitrógeno, se determinó la actividad enzimática de las cepas aisladas inoculando plantas de *L. leucocephala* y midiendo a los 75 días después de la siembra mediante la técnica de reducción de acetileno por cromatografía de gases (CIAT, 1988).

Recibido: enero 28 de 2005
Aceptado: mayo 2 de 2005

1. Investigadores; Programa de Fisiología y Nutrición Animal, Corpoica, C.I. Tibaitatá. e-mail: anamariareyo@gmail.com
2. Investigadora; Coordinadora del Programa de Recursos Biofísicos, Corpoica, C.I. Tibaitatá. e-mail: babadia@corpoica.org.co

Fase III o de vivero. A partir de la prueba de la actividad enzimática se seleccionó la mejor cepa (C-202) y una cepa control C-50 específica de *L. leucocephala* del banco de germoplasma.

Los géneros de micorrizas arbusculares (MA) utilizadas fueron *Glomus* sp. y *Entrophospora colombiana,* inóculos provenientes del Centro de Investigación de Agricultura Tropical (CIAT) que contenían una mezcla de hifas, suelo y un promedio de 100 esporas/g en plantas de *L. leucocephala.*

Para la fertilización nitrogenada se utilizaron 4 g de úrea por planta. Los tratamientos fueron: (T1) cepa C-50; (T2) C-50 + *Glomus sp.;* (T3) C50 + *E. colombiana;* (T4) C-50 + *Glomus sp.* + *E. colombiana;* (T5) *Glomus sp.* + *E. colombiana;* (T6) C-202; (T7) C-202 + *Glomus sp.;* (T8) C-202 + *E. colombiana;* (T9) C-202 + *Glomus sp.* + *E. colombiana;* 10) fertilización con N; (T11) testigo sin inocular y sin fertilizar.

El experimento se realizó bajo un diseño de bloques completos al azar con once tratamientos y cuatro repeticiones. Se utilizó el programa SAS (Stadistical Análisis System, 1997), mediante procedimientos de ANOVA y la comparación de medias con la prueba de Tukey. Los datos se recolectaron a los 30, 60, 90 y 120 días después de la germinación.

Se monitorearon y analizaron los componentes agronímicos y microbiológicos, según el siguiente esquema:

Variables agronómicas. Producción de materia fresca y seca total de la planta, peso seco y fresco de tallo y hoja, peso fresco y longitud de raíz, número y color de hojas. Para la evaluación de la composición química del forraje se utilizó el sistema de evaluación de Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) (Fox *et al.*, 1992) con énfasis en el fraccionamiento de la proteína (Lisitra *et al.*, 1996) y niveles de fósforo de la planta (Hanson, 1960).

Variables microbiológicas: En micorrizas: número de esporas (Gerdeman y Nicolson, 1963) y porcentaje de colonización (Philips y Hayman, 1970). En rizobios: número de esporas, peso fresco y seco de los nódulos (Vincent, 1970).

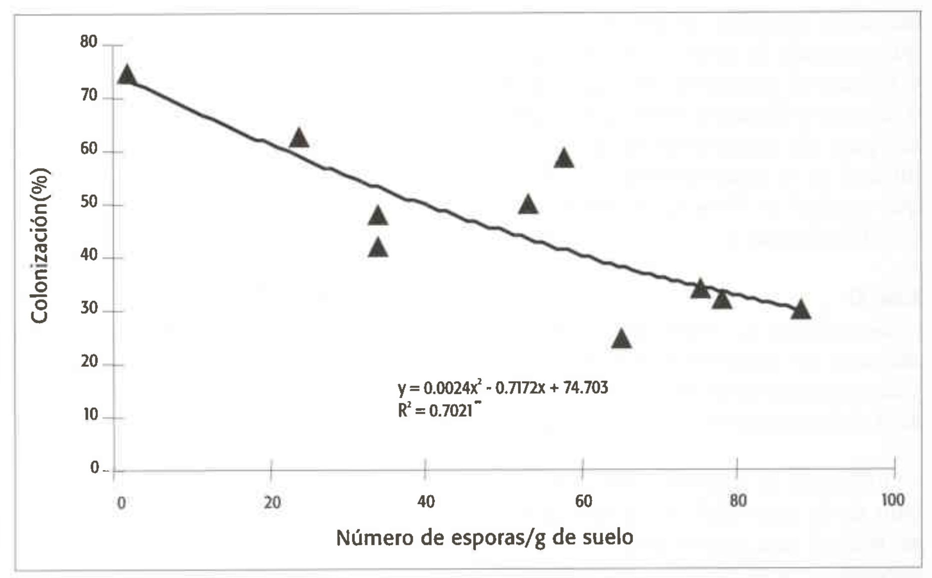


Figura 1. Relación entre la selectividad de leguminosas y el período de ocupación en praderas de *B. repens* al final de la época de lluvia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I

Análisis químicos inicial del sustrato. El pH del suelo fue de 6.2, adecuado para el establecimiento de *L. leucocephala* (Hu y Cheng, 1981). Los niveles de K, Cu, Ca, y Zn fueron altos y se hallaron niveles medios de MO, S, Na, Mn y B. Los niveles de Mg fueron bajos con una relación Ca:Mg de 7:1. El fósforo total fue alto (245 mg·kg^{-1}) así como las fracciones biológicamente disponibles. Por lo tanto, el suelo experimental presentó una dinámica positiva del P con tendencia a la disponibilidad y reserva (Tabla 1).

Microtofia. El preliminar de la microtofia se realizó con el fin de determinar la dependencia micorrícica de *L. leucocephala* en la zona de recolección de las muestras. Se presentó una relación inversa entre el porcentaje de colonización y el número de esporas, posi-

Tabla 1. Características químicas de los suelos del C.I. Motilonia (Codazzi-Cesar).

pH	M.O.	P	S	Ca	Mg	K	Na	CIC	C.E.	Fe	Cu	Mn	Zn	B
	(%)	mg·kg^{-1}		mol·kg^{-1}					Ds·m^{-1}	mg·kg^{-1}				
6.2	3.0	245	18	7.4	1.5	1.7	0.2	10.8	0.6	79	4.0	9.3	4.9	0.4

Fraccionamiento de P

Fracciones	Muestra
P disponible	58.6
Formas biológicamente disponibles para las plantas	
P inorgánico lábil	128.0
P orgánico fácilmente mineralizable	44.7
P menos disponible para las plantas	
P quimioadsorbido	112.7
P orgánico moderadamente resistente	109.5
P unido al calcio	254.2
P resistente o residual	130.9

blemente asociado al déficit de agua, que estimula la producción de esporas y reduce el porcentaje de colonización (Guerrero y Hodson, 1990), por lo tanto, la época de recolección de la muestra influyó en el alto recuento de esporas que explicó el 70% de la colonización (P<0.01) (Figura 1).

Fase II

Se aislaron 12 cepas las cuales presentaron un crecimiento rápido (3 días) y una reacción ácida en medio LMA con azul de bromotimol.

Reducción de acetileno. Para la estimación de la actividad de la nitrogenasa se realizó una curva patrón con seis concentraciones de etileno, realizando diluciones seriales 1/10 partiendo de una muestra de 100% de etileno. Al graficar los valores de la altura real corregida con los µmoles de etileno/ml con intersección en cero, se obtuvo la ecuación:

$$Y = 563{,}66x + 36888,\ R^2 = 0{,}992.$$

Según los resultados obtenidos en la prueba de reducción de acetileno, el mayor valor matemático lo reportó la cepa C-202 nativa con un valor de 0.90 µmol/ml de etileno/planta/h, seguido por las cepas C-50 control y C-200 nativa. Los menores valores se observaron en las cepas C-196, C-197, C-191 y el testigo. Las demás cepas mostraron niveles medios a bajos con respecto a los mayores valores obtenidos (Tabla 2).

En estudios realizados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (1987), con las leguminosas forrajeras *Centrosema macrocarpum* y *Desmodium ovalifolium* reportaron niveles de 0.8 y 0.4 µmol de etileno/planta/h, lo que demuestra la efectividad de las cepas C-202, C-200 y C-50. En la leguminosa arbórea *Gliricidia sepium o* "matarratón", Melchor *et al.* (2000) reportaron un valor de 0.38 µmol/ml de etileno/planta/h a las cuatro semanas después del corte; por lo tanto, se observa una alta actividad enzimática de las cepas nativas en evaluación.

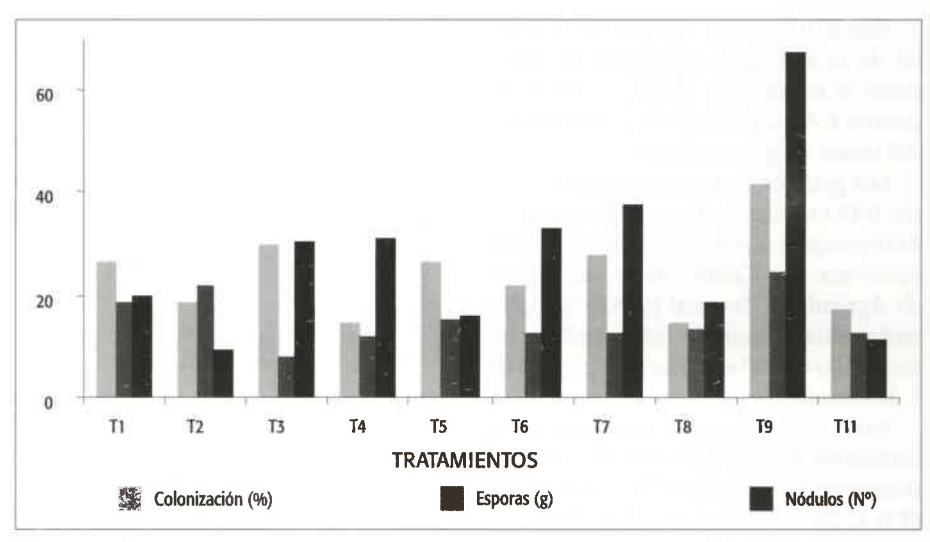


Figura 2. Respuesta microbiológica a los 30 días.

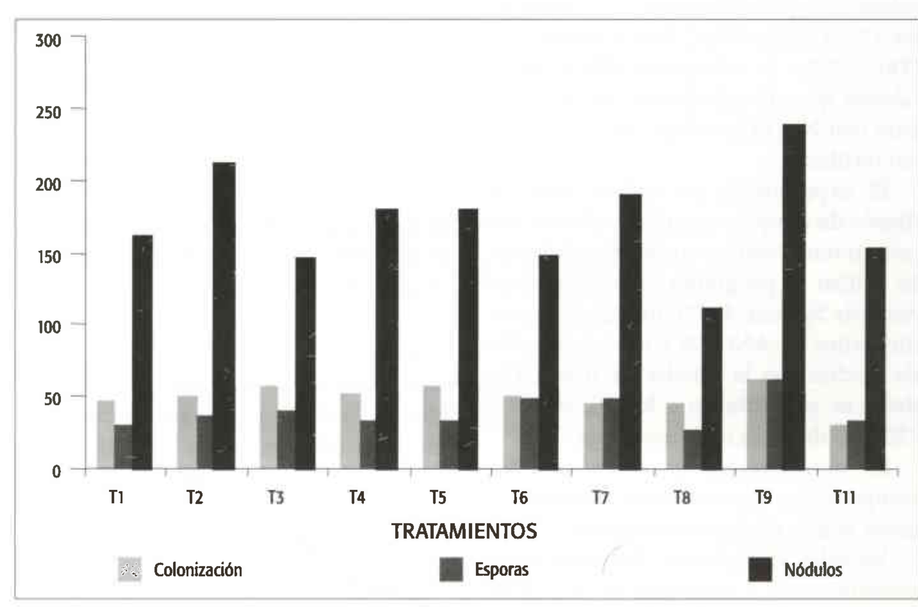


Figura 3. Respuesta microbiológica a los 60 días.

Fase III

Los valores agronómicos obtenidos en los cuatro meses de evaluación se muestra en la Tabla 3, mientras los resultados microbiológicos se consolidan en la Tabla 4.

Evaluación de la inoculación a los 30 días de edad. En la fase inicial se observó que el tratamiento T10 (fertilización nitrogenada) presentó un crecimiento lento, amarillamiento y muerte de muchas unidades experimentales, efecto asociado al tipo de fertilizante utilizado, por lo cual, se decidió no incluir este tratamiento en los análisis.

Tabla 2. Niveles de etileno de las cepas de rizobios de *L. leucocephala.*

Cepa No	µmol/ml etileno/ planta/h	Cepa No	µmol/ml etileno/ planta/h
C-190	0.153	C-198	0.318
C-191	0.068	C-199	0.062

[redacted]

Tabla 3. Respuesta agronómica de *Leucaena leucocephala* a la inoculación con rizobios y micorrizas.

Tts.	Peso seco hoja (g)				Peso seco tallo (g)				Peso fresco total (g)				Materia Seca total (g)			
Días	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120
Significancia	*	**	**	**	**	ns	ns	**	ns	*	**	**	ns	**	**	**
T1[1]	0.37 ab	4.24 b	6.08bc	4.71 b	0.12 b	6.30 a	8.74 a	8.92 ab	1.67 a	21.54 a	33.31 bc	49.28 bc	0.51 a	7.85 ab	14.82 b	13.64 b
T2	0.33 ab	3.32 b	5.90bc	3.79 b	0.14 ab	2.41 a	11.3 a	10.29 ab	1.38 a	16.05 ab	39.05 abc	47.88 bc	0.49 a	5.73 bc	17.23 ab	14.09 b
T3	0.50 ab	3.59 b	5.79bc	4.09 b	0.18 ab	2.63 a	9.93 a	9.32 ab	2.10 a	18.44 ab	37.84 abc	49.27 bc	0.67 a	6.27 abc	15.73 ab	14.22 b
T4	0.30 b	3.73 b	5.43bc	6.00 b	0.11 b	2.75 a	8.89 a	9.58 ab	1.26 a	19.19 ab	38.84 abc	54.88 ab	0.44 a	6.48 abc	14.33 b	15.59 ab
T5	0.61 ab	3.87 b	6.59 b	5.22 b	0.25 ab	2.60 a	9.39 a	10.15 ab	2.80 a	18.45 ab	40.37 ab	52.97 abc	0.87 a	6.47 abc	15.98 ab	15.38 b
T6	0.41 ab	3.63 b	6.36bc	6.91 ab	0.19 ab	2.31 a	9.78 a	8.74 ab	1.81 a	18.62 ab	39.79 abc	57.91 ab	0.61 a	5.94 abc	16.15 ab	15.66 ab
T7	0.71 ab	3.25 b	5.46bc	5.13 b	0.30 ab	2.06 a	6.85 a	7.62 b	2.87 a	16.11 ab	30.08 bc	48.61 bc	0.98 a	5.31 bc	12.50 b	12.76 b
T8	0.39 ab	3.74 b	5.38bc	7.27ab	0.15 ab	3.06 a	6.68 a	9.07 ab	1.39 a	18.53 ab	33.99 abc	52.51 abc	0.47 a	6.80 abc	14.07 b	16.34 ab
T9	0.88 a	5.99 a	10.1 a	10.5a	0.33 ab	2.82 a	13.0 a	12.89 a	1.11 a	21.41 a	49.68 a	64.83 a	0.42 a	8.81 a	23.16 a	23.04 a
T11	0.36 ab	1.95 c	3.86 c	3.96b	0.36 a	2.50 a	7.67 a	7.33 b	2.65 a	12.86 b	24.53 c	39.96 c	0.85 a	4.46 c	11.54 b	11.29 b

Tts.	Peso fresco raíz (g)				Longitud de raíz (cm)				Altura (cm)			
Días	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120
Significancia	*	**	**	**	**	ns	**	**	**	**	**	**
T1	1.26ab	7.6 ab	25.29 b	26.77 ab	31.43 ab	51.60 a	60.3 bc	81.0 b	11.65 abc	61.0 ab	87.6 ab	93.0 ab
T2	0.48 b	7.0 ab	23.98 b	21.59 b	22.89 ab	55.82 a	70.8 ab	79.2 bc	11.80 abc	48.0 abc	101 ab	90.2 ab
T3	1.45 ab	7.2 b	23.98 b	26.71 ab	39.03 ab	52.70 a	59.5 bc	70.2 bc	12.43 abc	53.9 abc	95.6 ab	92.6 ab
T4	0.82 ab	6.4 ab	24.02 b	24.15 ab	18.73 b	53.45 a	69.0 ab	80.0 bc	11.20 abc	51.0 abc	82.4 bc	116.7 a
T5	1.74 ab	7.9 ab	27.72 ab	24.94 ab	39.13 ab	50.70 a	68.0 ab	87.0 b	11.93 abc	43.3 bc	89.0 ab	92.2 ab
T6	1.05 ab	6.76 ab	19.84 bc	27.32 ab	26.08 ab	52.92 a	75.8 b	84.0 b	12.40 abc	52.1 abc	97.4 ab	101.5 ab
T7	1.74 ab	6.2 ab	20.05 bc	25.74 ab	32.45 ab	43.57 a	58.8 bc	71.6 bc	15.53 ab	46.1 abc	88.4 ab	88.5 ab
T8	0.79 ab	6.7 ab	24.41 b	22.32 b	22.85 ab	44.62	68.3 ab	74.1 bc	10.13 cb	55.8 abc	93.3 ab	91.75 ab
T9	2.08 a	9.2 a	34.75 a	35.74 a	43.84 a	57.70 a	90.0 a	120 a	18.36 a	63.2 a	117.3 a	129.2 a
T11	0.53 ab	5.0 b	14.52 c	16.25 b	20.81 ab	36.02 a	46.0 c	48.2 c	7.50 c	39.0 c	51.2 c	68.2 b

[1] T1: C-50; T2: C-50 + *Glomus sp.*; T3: C-50 + *E. colombiana*; T4: C-50 + *Glomus+ E. colombiana*; T5: *Glomus* + *E. colombiana*;T6: C-202; T7: C-202 + *Glomus*; T8: C-202 + *E. colombiana*; T9: C-202 + *Glomus* + *E. colombiana*; T11: Testigo.
** Diferencias altamente significativas (P< 0.01). * Diferencias significativas (P<0.05). ns: no existen diferencias. Promedios en una misma columna con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey (P> 0.05).

ficativas (P<0.01): el T9 presentó 62.5 esporas/g superando a los tratamientos testigo, T1, T5 y T8 (33.0, 29.75, 33.0 y 26.25 esporas/g respectivamente).

Los resultados obtenidos en el número de nódulos presentaron diferencias significativas (P< 0.05) entre los tratamientos, dentro de los cuales, el tratamiento T9 con un valor promedio de 238.25 nódulos/planta con lo que superó al tratamiento T7 (109 nódulos/planta). A pesar que el testigo no fue inoculado las plantas presentaron 151.75 nódulos/planta confirmando la dependencia de la simbiosis de *L. leucocephala* (Figura 2).

El efecto positivo manifestado por las plantas se puede asociar a un mayor desarrollo radicular promovido por la inoculación, que le permite a la leguminosa extraer mayor cantidad de nutrientes para su posterior traslocación a la parte aérea. La asociación micorrícicas ha demostrado que no solo incrementa la biomasa vegetal, sino que también influye en su distribución en la parte aérea y raíz de la planta (Pearson y Azcón 1991).

Evaluación de la inoculación a los 60 días de edad. El tratamiento T9 presentó mayores respuestas superando al testigo en el peso fresco y seco de la hoja, producción de materia seca total, peso seco de la raíz y altura en un 138.3%, 207.1%, 97.5%, 84.8% y 62.1% respectivamente, expresando un mejor crecimiento y producción de biomasa, respuesta posiblemente asociada con un mayor desarrollo radicular, que estimuló a la leguminosa a extraer más nutrientes y posterior translocación a la parte aérea (Pearson y Azcón, 1991) (Figura 3).

Evaluación la inoculación a los 90 días de edad. En la producción de forraje verde las mejores respuestas fueron los tratamientos T9 y T5 superando al testigo en 123.4% y 72%, respectivamente. En la producción total de MS, el tratamiento T9 superó a los tratamientos T11, T1, T4, T7 y T8, y presentó un incremento del 100.6% con relación al testigo.

Estas respuestas obtenidas fueron superiores a los reportes de Ezenwa y Atta-Krah (1990) quienes encontraron una producción de 4.6 g/planta de MS para *L. leucocephala*; también superaron a los resultados obtenidos por De Lucena *et al.* (1992), quienes evaluaron *Scutellospora heterogama* asociada con *Rhizobium* y 80 kg·ha^{-1} de P_2O_5 obteniendo valores de 13.2 g/planta de MS. De igual manera, superan considerablemente los reportes de Michelsen y Rosendahl (1990), quienes reportaron 1.6 g/planta cuando se inoculó con *Rhizobium*, *G. etunicatum*, *G. mossae* y *G. occultum* a las 12 semanas y en suelos con 11 mg P.

Los mayores pesos frescos de la raíz los presentaron los tratamientos T9 y T5. La longitud de raíz fue mayor (P<0.01) en el tratamiento T9 y superó en 95.6% al testigo (Tabla 3). Estos resultados son

superiores a los reportados por Michelsen y Rosendahl (1990), quienes con *Rhizobium, G. etunicatum, G. mossae* y *G. occultum,* reportaron una longitud de raíz de 74.8 y 62.8 cm con y sin la aplicación de P, respectivamente.

El mayor número de esporas lo presentó el tratamiento T9, superando a los tratamientos testigo y T2. Este estudio demuestra la relación estrecha entre el número de esporas y el porcentaje de colonización, siendo el mayor valor para el tratamiento T9 (Tabla 4). Resultados similares fueron reportados por De Lucena *et al.* (1992) quienes evaluaron *Scutellospora heterogama* asociada con *Rhizobium* reportando valores de porcentaje de colonización de 68.7%. Los resultados en número de esporas superan notoriamente los reportados por Manjunath *et al.* (1984) quienes obtuvieron 138 esporas en 50 gr de suelo seco; sin embargo, reportan 71.2% de colonización, similar respuesta a la obtenida en esta fase de la investigación.

El mayor número de nódulos (Tabla 4) lo presentó el tratamiento T9 superando en 407.4% al testigo y a todos los demás tratamientos inoculados, excepto a T8. Estos resultados superan notoriamente a los reportes de Manjunath *et al.* (1984), quienes observaron 38 nódulos en *L. leucocephala* inoculada con *G. fasciculatum* y *Rhizobium*; de igual manera, se superan los reportes de Ezenwa & Atta-Krah (1990) quienes obtuvieron 38 nódulos para *L. leucocephala* y a los reportes de Michelsen & Rosendahl (1990), quienes evaluaron la inoculación con *Rhizobium, G. etunicatum, G. mossae* y *G. occultum* y la aplicación de P y riego, con valores de 63 y 50 nodulos/planta. El peso fresco de los nódulos presentó diferencias (P<0.05) entre tratamientos, el mayor valor lo obtuvo el T2 superando al testigo en un 339.4% (Tabla 4).

Estos resultados demuestran claramente el efecto de la doble inoculación con cepas nativas de rizobios asociadas con MA, pues se corobora el efecto positivo en la nodulación (Date, 1977; Trinick, 1968).

Evaluación de la doble inoculación a los 120 días. Teniendo en cuenta las características y uso de la leguminosa *L. leucocephala* dentro de los sistemas silvopastoriles, se realizó un muestreo a los 120 días después de la siembra; los datos obtenidos se muestran en las Tablas 3 y 4.

Las mayores producciones en peso fresco de hojas las reportaron los tratamientos T9, T6 y T8 con rendimientos de 10.52, 6.91 y 7.27 g MS hojas/planta, respectivamente. El tratamiento T9 superó a todos los tratamientos con la excepción de los tratamientos T6 y T8. La producción de MS de la hojas fue superior en un 165.2 % del T9 con relación al testigo (3.96 g MS hojas/planta).

Los rendimientos en peso fresco total de la planta presentaron diferencias significativas (P<0.01): el mayor valor lo reportó el tratamiento T9 que superó a los tratamientos T1, T2, T3, T7 y T11.

Respecto de la materia seca total, el tratamiento T9 superó a todos los tratamientos con excepción de T6 y T8, alcanzando un incremento del 107.18% con respecto al testigo (11.298 g MS/planta). Resultados similares fueron reportados por Ezenwa y Atta-Krah (1990), quienes obtuvieron valores de 18.11 g MS/planta con la inoculación de *Rhizobium* y *Glomus sp.* La producción de biomasa de este ensayo fue superior a la reportada por De Lucena *et al.* (1992), quienes evaluaron *S. heterogama, Rhizobium* y con aplicación de P (100 y 200 $kg \cdot ha^{-1}$ de roca fosfórica) reportando valores de 9.14 y 12.29 g MS/planta, respectivamente.

En la variable del peso fresco de la raíz (P<0.01) el T9 obtuvo el mayor resultado (35.743 g/planta), superando al testigo, T2 y T8 (125, 21.59 y 22.31 g/planta, respectivamente); el T9 obtuvo un incremento de 119.91% respecto al testigo. En cuanto la longitud de la raíz, el tratamiento T9 (120.35 cm) obtuvo diferencias altamente significativas (P<0.01) con respecto a los demás tratamientos, superando en 149.43% al testigo. Estos resultados son superiores a los reportados por Ezenwa y Atta-Krah (1990), quienes observaron longitudes de 84.75 cm en *L. leucocephala.* Con relación a las variables microbiológicas, el número de esporas presentó valores medios entre 60.8 a 103.75 esporas/planta, donde el T9 superó a los tratamientos T11, T1, T2, T3 y T8.

El porcentaje de colonización no presentó diferencias significativas (P>0.05) aunque el mayor valor lo obtuvo el T9 (92.2%), valor superior a los reportados por De Lucena *et al.* (1992), quienes eva-

Tabla 4. Respuesta microbiológica de *L. leucocephala* a los 90 y 120 días.

Tratamientos	Micorrizas		Rizobios			
	Esporas (g)	Esporas (g)	Nódulos (N°)	Nódulos (N°)	Peso freso nódulos (g)	Peso freso nódulos (g)
Días	90	120	90	120	90	120
	*	**	**	**	*	*
T1[1]	57.5 ab	69.5 bc	72.50 c	96.5 bc	0.95 ab	0.73 abc
T2	48.8 b	60.8 c	115.2 bc	164.3 bc	1.67 a	0.303 c
T3	63.0 ab	75.0 abc	66.75 c	90.8 c	0.67 ab	0.49abc
T4	63.8 ab	75.8 abc	143.5 bc	173.5 bc	0.75 ab	1.35 ab
T5	69.5 ab	99.3 ab	63.25 c	87.3 c	1.27 ab	0.39 bc
T6	65.3 ab	77.3 ab	126.5 bc	150.5 bc	1.1 ab	0.87 abc
T7	64.0 ab	73. abc	93.25 bc	122.3 bc	0.68 ab	0.76 abc
T8	56.0 ab	68 abc	202.2 ab	228.8 ab	0.66 ab	1.47 a
T9	91.8 a	103.8 a	291.75 a	324 a	0.99 ab	0.70 abc
T11	54.8 b	66.8 c	57.50 c	81.5 c	0.38 b	0.54 abc

[1] T1: C-50; T2: C-50 + Glomus sp; T3: C-50 + *E. colombiana*; T4: C-50 + *Glomus* + *E. colombiana*; T5: *Glomus* + *E. colombiana*;T6: C-202; T7: C-202 + *Glomus*; T8: C-202 + *E. colombiana*; T9: C-202 + *Glomus* + *E. colombiana*; T11: Testigo
** Diferencias altamente significativas (P< 0.01). * Diferencias significativas (P<0.05). ns: no existen diferencias. Promedios en una misma columna con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey (P> 0.05).

Tabla 5. Composición química del forraje de *Leucaena leucocephala* a la inoculación con rizobios y micorrizas (cosechado a 120 días).

Tratamientos	Fracciones de proteína (CNCPS)				Composición nutricional				
	a + b1 (% PC)	b2 (% PC)	b3 (% PC)	c (% PC)	PC (%)	N (g/planta)	PDIG (%)	FDN (%)	P (%)
	ns	ns	**	*	ns	**	**	ns	**
T1[1]	22.53 a	27.74 a	34.61 b	15 ab	19.48 a	2.64 b	84.8 ab	50.22 a	0.21 b
T2	24.40 a	29.05 a	34.55 b	14.5 ab	19.54 a	2.77 b	85.4 ab	48.97 a	0.71 b
T3	20.69 a	29.83 a	34.26 b	15.2 ab	19.91 a	2.83 a	84.7 ab	49.98 a	0.19 b
T4	22.16 a	27.18 a	33.86 b	16.7 ab	20.17 a	3.23 b	83.2 ab	51.53 a	0.19 b
T5	19.00 a	27.45 a	34.11 b	19.42 a	20.24 a	3.14 ab	50.57 b	46.70 a	0.19 b
T6	50.57 a	27.03 a	35.5 ab	16.8 ab	19.57 a	3.03 ab	83.1 ab	46.90 a	0.19 b
T7	23.44 a	26.54 a	36.0 ab	13.9 ab	18.21 a	2.28 b	86.0 ab	46.52 a	0.23 a
T8	23.22 a	26.31 a	35.7 ab	14.7 ab	19.31 a	3.13 ab	85.2 ab	48.76 a	0.21 b
T9	23.00 a	27.12 a	40.04 a	9.82 b	20.54 a	4.77 a	90.18 a	46.31 a	0.28 a
T11	23.85 a	26.76 a	33.35 b	16.0 ab	20.43 a	2.29 b	83.9 ab	46.48 a	0.22 a

[1] T1: C-50; T2: C-50 + *Glomus sp*; T3: C-50 + *E. colombiana*; T4: C-50 + *Glomus* + *E. colombiana*; T5: *Glomus* + *E. colombiana*; T6: C-202; T7: C-202 + *Glomus*; T8: C-202 + *E. colombiana*; T9: C-202 + *Glomus* +*E. colombiana*; T11:Testigo

** Diferencias altamente significativas (P< 0.01). * Diferencias significativas (P<0.05). ns: no existen diferencias. Promedios en una misma columna con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey (P> 0.05).

luaron la doble inoculación con *S. heterogama* y *Rhizobium* obteniendo un 78% en la colonización con la aplicación de 100 kg·ha^{-1} de roca fosfórica.

El número de nódulos presentó diferencias altamente significativas (P<0.01) entre los tratamientos. Los tratamientos con mayor número de nódulos fueron T9 y T8 (324 y 228.7 nódulos/planta). El T9 fue superior estadísticamente a los demás tratamientos, con excepción del T8; así mismo, superó en 297.5% al testigo (81.5 nódulos/planta). Las investigaciones de De Lucena *et al.* (1992) quienes evaluaron la inoculación en *L. leucocephala* con *S. heterogama, Rhizobium* y fertilización (200 kg·ha^{-1} de P_2O_5), obteniendo menores resultados a los reportados en esta investigación, con un valor de 36 nódulos; de igual manera esta investigación superó los resultados reportados por Ezenwa y Atta-Krah (1990), quienes lograron un recuento de 133 nódulos/planta.

El peso fresco de los nódulos presentó diferencias entre tratamientos (P<0.01): el valor mayor lo presentó el tratamiento T8 superando estadísticamente a los tratamientos T5 y T2. Aunque no se presentaron diferencias significativas se evidenció una tendencia similar en la variable peso seco de los nódulos, en la cual, el mayor y menor peso lo obtuvieron los tratamiento T8 y T2. Estos valores son superiores a los reportados por De Lucena *et al.* (1992) con valores de 0.08 g/nódulos/planta. Otras investigaciones realizadas por Ezenwa y Atta-Krah (1990), reportaron mayores resultados que los obtenidos en esta investigación, con un peso de 3.36 g para *L. leucocephala*.

El efecto positivo y significativo de la doble inoculación se puede explicar en gran medida por la cooperación entre ambos microorganismos responsables de las simbiosis, efectos de fitohormonas producidas por enzimas pécticas que debilitan la pared celular de la planta hospedadora, y por la producción de polisacáridos extracelulares de los rizobios que incrementan la permeabilidad celular y radicular necesarios para la formación de MA estimulando su penetración en la raíz (Azcón *et al.*, 1992).

Esta investigación muestra que existe una íntima relación entre la producción de materia seca de *L. leucocephala* y el recuento de esporas, el cual la explica en un 92% (P< 0.01) durante los 120 días de experimentación. Para esta investigación existe una relación positiva entre la producción de *L. leucocephala* y el número de nódulos de la planta a los 30, 60, 90 y 120 días. La producción de materia seca del forraje está definida en un 86% por la capacidad de la cepa de rizobios C-202 en la producción de nódulos (P<0.01).

Es importante apreciar que durante todo el periodo experimental existió una intima relación entre el número de nódulos y el número de esporas, pues éste explica en un 92% el número de nódulos. Este efecto fue explicado por Azcón y Barea (1980), quienes reportan que las leguminosas que presentan doble simbiosis normalmente muestran mayor nodulación; de igual manera, Costa *et al.* (1987), reportaron el efecto positivo de la inoculación con la micorriza *G. margarita* que incrementó el número y peso de los nódulos.

Evaluación de la composición química del forraje. La composición química de forraje de *L. leucocephala* cosechada a los 120 días de edad, con énfasis en las fracciones proteicas y el nivel de fósforo, se muestra en la Tabla 5.

El contenido de nitrógeno total (como proteína cruda, PC), no fue afectado significativamente por los tratamientos (P>0.05), aunque se observó una tendencia a presentar mayores niveles de proteína en el tratamiento T9 (20.45%). Resultados similares fueron reportados por Saavedra *et al.* (1987) citado por Chamorro (2002), quienes obtuvieron un nivel de 20.30% en forraje de *L. leucocephala* a los 98 días.

Los niveles de nitrógeno foliar fueron superiores a los reportados por De Lucena *et al.* (1992), quienes inocularon con *A. heterogama* y *Rhizobium* logrando valores de nitrógeno de 2.5% (15.62% PC). De igual manera, Manjunath *et al.* (1984) reportaron valores de N de 2.25% (14.08% PC).

En algunas investigaciones la fertilización con N y P supera los resultados de calidad obtenidos en esta investigación, como los reportes de Razz *et al.* (1995) quienes evaluaron *L. leucocephala* con diferentes niveles de fertilización nitrogenada y fosfórica, considerando los mismos ecotipos en condiciones de bosque seco tropical, pero no informaron efectos significativos de éstos sobre los contenidos de N y PC en la fracción fina.

En cuanto la producción total de proteína por planta, los mayores valores fueron obtenidos por los tratamientos T9, T8, T6 y T4. El T9 fue superior a los demás tratamientos y superó en un 107.18% al testigo; valores inferiores fueron conseguidos por Costa *et al.* (1987), quienes demostraron el efecto positivo de la inoculación con micorriza *G. margarita* al incrementar el contenido de N en un 61.9% con respecto al testigo y en un 47.82% con la aplicación de P. De igual manera, De Lucena *et al.* (1990) con la inoculación de micorrizas *A. muricata* y *Rhizobium* lograron el máximo efecto con la doble inoculación que con inoculaciones independientes, reportando incrementos de nitrógeno del 103.3%.

Dentro de las proteínas existen fracciones que en los rumiantes se degradan a diferentes tasas en el rumen; éstas pueden ser solubles, que son rápidamente (a) y medianamente degradables (b1) y la fracción lentamente degradable denominada b2 (Licitra *et al.*, 1996). En esta investigación las fracciones solubles (a + b1) no presentaron diferencias (P>0.05) entre tratamientos, valores similares a los reportados por Fox *et al.* (1992) en la biblioteca del CNCPS (23.75%). De igual manera, los reportes de Chamorro *et al.* (2002) obtuvieron niveles de 21.95% de proteína soluble en *L. leucocephala* bajo ramoneo en el Caribe colombiano.

En la evaluación de la fracción b2 no se advirtió un efecto de los tratamientos (P>0.05). Estos valores concuerdan con los reportes de Fox *et al.* (1992), quienes informaron valores de 26.6%, aunque difieren de los valores obtenidos por Chamorro *et al.* (2002) quienes evaluaron la selectividad de bovinos ramoneando *L. leucocephala*, y la dieta seleccionada con valores de la fracción b2 de 47.66% de la proteína cruda.

Cierta cantidad de proteína de la dieta escapa a la degradación ruminal y pasa al intestino donde es absorbida, por lo cual se le denomina "proteína sobrepasante" y conforma la fracción b3. Esta fracción es la de mayor eficiencia para el rumiante y principalmente está formada por el nitrógeno verdadero ligado al FDN, que en el rumen se degrada entre un 10 y un 25%; el resto pasa al intestino delgado donde las proteasas intestinales digieren el 80% sobrepasante (Fox *et al*, 1992).

En esta investigación el porcentaje de la fracción b3 presenta una respuesta significativa (P<0.01) entre tratamientos. La mayor respuesta fue del tratamiento T9 (40.04%). Resultados superiores a los obtenidos en los tratamientos T1 a T5 y el T11 fueron reportados por Fox *et al.* (1992) logrando un valor de 33.9%.

Chamorro (2002) obtuvo valores similares (44.97%) con *L. leucocephala*, cuando comparó 29 especies arbóreas utilizadas en la alimentación de bovinos en el Valle del Cesar, en el cual, el promedio de las especies fue de 43.10%, indicando que existe una gran oportunidad de utilizar esta leguminosa como fuente de proteína protegida en suplementos para animales de alta producción.

En *L. leucocephala* la protección de la proteína a la degradación ruminal puede estar influida por los contenidos de taninos que se encuentran recubriendo las moléculas proteicas del forraje y hacen que la proteína pueda ser utilizada sólo parcialmente por las bacterias existentes en el rumen. Estos compuestos son muy resistentes a la acción enzimática con la consiguiente disminución de la digestibilidad de la proteína, de la hidrólisis de los enlaces peptídicos y de la disponibilidad de aminoácidos (Nocek *et al.*, 1986).

Es claro que la utilización de la doble inoculación de rizobios asociadas con las micorrizas *Glomus sp.* y *E. colombiana* en *L. leucocephala*, puede ofrecer una solución para proporcionar proteína sobrepasante e incrementar la cantidad de proteína digestible. En nuestro país ,la ventaja de utilizar proteína protegida naturalmente se relaciona con la mayor eficiencia en la utilización de nutrientes absorbidos y, fundamentalmente, con el incremento del consumo voluntario de materia seca.

La fracción de proteína que no se utiliza en ningún compartimiento del tracto gastrointestinal se denomina "fracción c" y es una proteína constituida por el nitrógeno ligado al FDA. Los valores de esta fracción fueron diferentes (P<0.01), entre el tratamiento T5 (19.42%) y el T9 (9.82%). Valores promedios similares a los aquí encontrados fueron reportados por Fox *et al.* (1992) con niveles del 14.5%; de igual manera, estos valores son similares a los reportados por Chamorro *et al.* (2002).

Los resultados obtenidos señalan que en la evaluación de la proteína digestible se presentaron diferencias entre tratamientos (P<0.01), y el mayor valor lo presentó el T9 que superó al tratamiento T5, valores similares a los reportados por Chamorro *et al.* (2002) quienes informan del 81,79% de proteína digestible.

El contenido de fósforo presentó diferencias altamente significativas entre tratamientos (P<0.01), con los mayores niveles en el tratamiento T9 que superó a los demás tratamientos, con excepción de T7 y T11. Estos valores superan los reportados por Manjunath *et al.* (1989) quienes obtuvieron 0.10% en *L. leucocephala* inoculada con *G. aggregatum* y con aplicación de niveles de 5.44 g de P/planta. De igual manera, los resultados de esta investigación son superiores a los reportes de De Lucena *et al.* (1992), quienes evaluaron *S. heterogama* y *Rhizobium*, obteniendo valores de 0.17%, Sin embargo, los resultados de esta investigación son inferiores a los valores hallados por Michelsen y Rosendahl (1990) quienes, en *L. Leucocephala* inoculada con *Rhizobium* asociado con *G. etunicatum*, *G. mossae* y *G. occultum*, bajo aplicaciones de P y riego, reportan valores de 0.36 y 0.35% en los tratamiento con la doble inoculación y aplicación o no de fósforo, respectivamente.

CONCLUSIONES

La prueba de reducción de acetileno permitió comparar la efectividad de las cepas aisladas a partir de los nódulos de *L. leucocephala*, obteniéndose una mejor respuesta productiva con la cepa C-202.

L. leucocephala demostró alta capacidad de asociación con las cepas de rizobios aisladas de la misma planta, produciendo una mayor respuesta en la interacción con *Glomus sp.* asociada con *E. colombiana*, sinergismo positivo observado en el crecimiento y la producción de forraje, con un mayor nivel proteico y mineral en la fase de vivero.

Las cepas de micorrizas evaluadas mostraron un comportamiento diferente entre sí, mostrando infectividad más no efectividad en el tratamiento sin inocular. Esto corrobora la necesidad de utilizar la doble inoculación con cepas nativas de MA efectivas para lograr una mayor respuesta productiva de esta *L. leucocephala*.

El trabajo demostró el potencial de *Glomus sp.*, y *E. colombiana* en consorcio con las especies nativas, para asociarse con la leguminosa *L. leucocephala* en suelos con altos niveles de fósforo, donde la colonización aumentó en un 81% la producción de forraje verde total, y en un 71% el peso seco de la hoja.

La doble inoculación con la cepa C-202 nativa asociada con *E. colombiana* y *Glomus sp.* en el suelo experimental, per-

mitió una alta nodulación en *L. leucocephala*, influyendo en el 84% del peso seco de la hoja y en el 86% de la producción de MS total.

La asociación de las cepa C-202 y las MA evaluadas permitió incrementar significativamente tanto la producción de forraje de *L. leucocephala* (162.5%), la cantidad de proteína cruda (107.18%), como su calidad nutricional, alto porcentaje de la fracción sobrepasante b3 y fósforo, lo que favorece la mayor utilización de los nutrientes por el rumiante.

La utilización de la cepa C-202 nativa en asocio con *E. colombiana* y *Glomus* sp, permitió disminuir sustancialmente el tiempo en la fase de vivero de *L. leucocephala* a 60 días.

BIBLIOGRAFÍA

Azcón, A. y Barea, J.M. 1980. Avances recientes en el estudio de las micorrizas arbusculares: factores que afectan su formación, función y aplicaciones prácticas en la agricultura. Manuales de edafología 43: 3-4.

Azcón-Aguilar, C.; Barceló, A.; Vidal, M. y De la Viña, Y. 1992. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. Agronomie 12:837-840.

CIAT. 1986. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Informe Anual Microbiología de Suelos. Documento 24:157-159.

CIAT. 1988. Simbiosis leguminosas-*Rhizobium*. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo. Sección Microbiología de Suelos. Programa de Pastos Tropicales y Programa de Fríjol.

CORPOICA. 1999. Plan de la Ganadería Memorias. Tecnología para la producción de leche y carne en sistemas de producción bovina de la Región Caribe. pp. 1-8.

Costa, N.; Dionisio, J. y Anghinoni, I. 1987. Efeico de enoculaçao de fongus endomicorrizicos e de fontes de fosforo sobre o crecimiento do camping-sudado e da *Leucaena leucocephala*. Agronomía Sulriograndesnde 23(1): 65-76.

Chamorro, D. 2000. Principales resultados en el área temática de silvopastoreo dentro del Plan de Modernización Tecnológica de la Ganadería Bovina colombiana. En. Memorias del Primer Curso Intensivo de Silvopastoreo Colombo-Cubano. Corpoica (en CD-Rom).

Chamorro, D. 2002. Importancia de la proteína en la nutrición de rumiantes con énfasis en la utilización de proteínas de especies arbóreas. En memorias del Seminario-Taller Internacional sobre Manejo de La Proteína en Producción de Ganado Bovino. Corpoica. pp. 16.

Chamorro, D.; Gallo, B.; Jorge, E.; Arcos, D.; Juan, C.; Vanegas R. y Miguel A. 1998. Gramíneas y leguminosas, consideraciones agrozootécnicas para ganaderías del trópico bajo. Corpoica, Regional 6, Centro de Investigación Nataima. 181 p.

Chamorro, D.; Roncallo, B.; Cipagauta, M.; Sánchez, M.; Barros, J.; Arcos J.; Acero J.; Hernández J.; Bonilla, R.; Lanao, S.; Vuelvas, S.; Torres E.; Sierra M.; Carrero G.; Romero H. y Vanegas, M. 2002. Los sistemas silvopastoriles y su impacto en la ganadería del trópico bajo colombiano. Manual Técnico. Plan de Modernización Tecnológica de la Ganadería Bovina Colombiana. 98 p.

Date, R.A. 1977. Inoculation of tropical pasture legumes. En: Exploiting the Legume *Rhizobium* Symbiosis in Tropical. 23 p.

De Lucena, N.; Valdinei P. y Veasey, E. 1992. Effect of phosphate fertilization and mycorrhizal inoculation on growth and phosphorus uptake of *Leucaena*. Leucaena Research Reports. 13: 9-12.

Ezenwa, I. y Atta-Krah A.N. 1990. Initial growth and nodule development of *Leucaena* and *Gliricidia*. Leucaena Research Reports. 11 (1): 99-101.

Fox, D.G.; Sniffen, C.J.; O'Connor, J.D.; Russel, J.B. y Van Soest, P.J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. Journal Animal Science. 70: 3.578-3.596.

Gerdeman, J. y Nicholson T. 1963. Spores of mycorrhizal engonone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. British Mycology Society 46(2): 235-244.

Guerrero, E. y Hodson, E. 1990. Influencia del régimen de lluvias sobre la micorriza de una *Podocapaceae* andina. En: Resumen del V Congreso Latinoamericano de Botánica y I Simposio Latinoamericano de micorrizas. La Habana, Cuba. Resumen. p. 24.

Hanson, J. 1960. Determinación de fósforo total en tejido concentrado. SCI Food Agriculture. 172 p.

Hu, TW. y Chen, W.E. 1981. Council for agrigultural planning and developed. Taipei, Taiwan. Leuaecaha Resarch Review. 2: 48.

IGAC. 1996. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Mapas de zonas agroecológicas y usos del suelo de Colombia. Bogotá. 300 p.

Licitra, G.; Hernández, T.M. y Van Soest, P.J. 1996. Standardization of proccedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. Animal Feed Science Technology. 57: 347-358.

Manjunath, A.; Bagyaraj, D. y Gopala, H. 1984. Dual inoculation with VA mycorrhiza and *Rhizobium* is beneficial to *Leucaena*. Plant and Soil. 78: 455-458.

Manjunath, A.; Hue, N. y Habte, M. 1989. Response of *Leucaena leucocephala* to vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization and rock phosphate fertilization in an oxisol. Plant and Soil. 114: 124-133.

Melchor, J.M.; Vargas, J.; Ferrera, R.; Etchevers, J. y Velásquez, A. 2000. Actividad de la nitrogenasa en *Gliricidia sepium* en diferentes regímenes de poda Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México. pp. 299-308.

Michelsen, A., y Rhosendahl, S. 1990. The effect of VA mycorrhizal fungi, phosphorus and drought stress on the growth of *Acacia nilotica* and *Leucaena leucocephala*. Plant and Soil 115: 7-17.

Nocek, J.E; Janet B. y Marianne R. 1986. Drying rate and ruminal nutrient digestion of chemically treated alfalfa hay. Crop Science. 26: 813.

Pearson, G. y Azcón, C. 1991. Fisiología de las micorrizas vesículo-arbusculares. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid-España. pp. 176-202.

Philips, J.M y Hayman, D.S 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal in tropical soils. Transactions of the Brithish Mycological Society 55: 159-161.

Razz, R.; Clavero, T.; Ferrer, O.; Pérez, J. y Rodríguez, A. 1995. Efecto de la fertilización con N y P sobre el valor nutritivo de 2 ecotipos de *Leucaena leucocephala*. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 12: 325.

SAS. 1997. The SAS Sistem. Version Seven. By SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. User's Guide: Basics.

Trinck, M.J. 1968. Interactions of the microflora from nodulation problem and no-problem soils towards *Rhizobium spp.* on agar culture. Soil Biology Biochemical 15: 295-301.

Vicent, J.M. 1970. Manual práctico de rizobiología. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 420 p.